

(19)日本国特許庁(JP)

CUSTOMER COPY
Complies with Copyright Law
Document Delivery Service
1-800-678-4337

Brian (Wood Lab)
2-3931

(11)特許出願公開番号

特開平5-247054

(43)公開日 平成5年(1993)9月24日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 D 498/22		8415-4C		
// A 6 1 K 31/55	ADZ	7252-4C		
(C 0 7 D 498/22				
209:00				
273:00				

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-45851

(22)出願日 平成4年(1992)3月4日

(71)出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72)発明者 大塚 晏央

所沢市東所沢和田2-14-6

(72)発明者 西亦 豊希

横浜市保土ヶ谷区岡沢町3-20大石荘2-1

(72)発明者 節原 謙一

綾瀬市寺尾北3-14-7

(72)発明者 飯森 隆昌

川崎市幸区戸手本町2-194-210

(72)発明者 大石 武

新座市野火止5-17-14

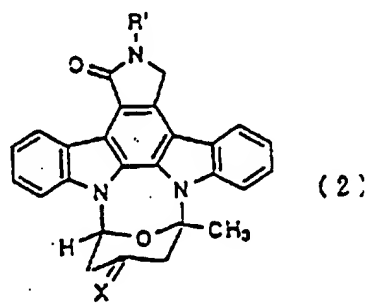
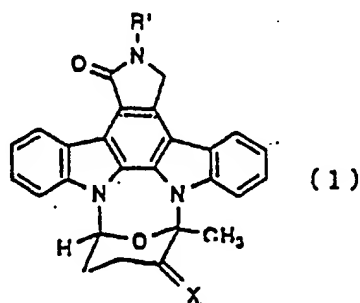
(54)【発明の名称】 SF2370誘導体及びその製造法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 本発明は抗生物質SF2370から誘導される新規化合物及びその製造法を提供することを目的とする。

【構成】 抗生物質SF2370を出発物質として化学*

*修飾により得られる新規な一般式(1)、及び一般式(2)の化合物はグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌などに対して抗菌作用を有し、かつプロテインキナーゼC(PKC)を阻害する。

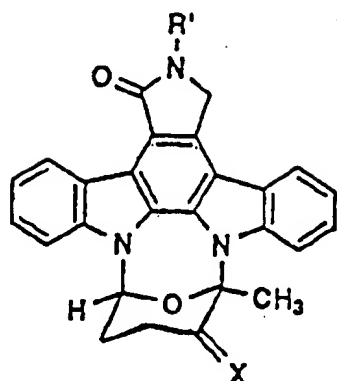


【式中R¹はH, CHO, CH₃CO等、Xは=O又はHとOR(但しRはH, C₁₋₄-アシル基)を表わす】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)の化合物

【化1】

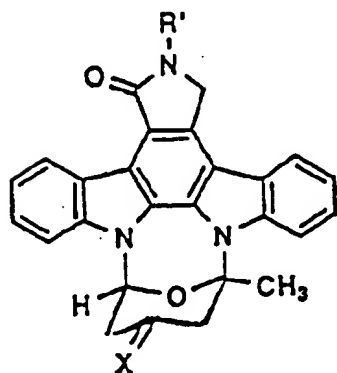


(1)

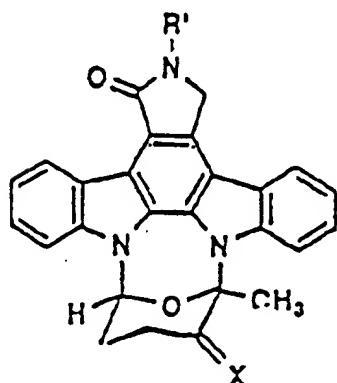
〔式中、 R^1 は水素原子あるいはホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基より選ばれるアミノ基の保護基を表し、 $=X$ は $=O$ 、又は H と OR (基中、 R は水素原子又は炭素数1~4の低級アシル基)を表す]

【請求項2】 一般式(2)の化合物

【化2】



(2)



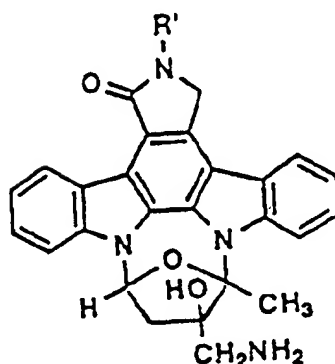
(1)

〔式中、 R^1 は前記の意味を表し、 $=X$ は $=O$ 、又は H と OR (基中、 R は水素原子又は炭素数1~4の低級アシル基)を表す]

〔式中、 R^1 は水素原子あるいはホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基より選ばれるアミノ基の保護基を表し、 $=X$ は $=O$ 、又は H と OR (基中、 R は水素原子又は炭素数1~4の低級アシル基)を表す]

【請求項3】 一般式(3)

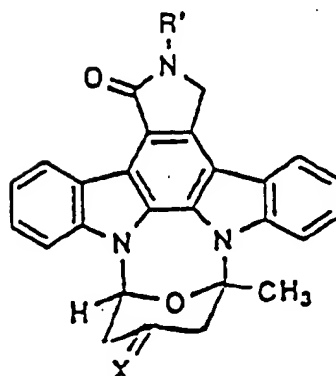
【化3】



(3)

〔式中、 R^1 は水素原子あるいはホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基より選ばれるアミノ基の保護基を表す]で表される化合物のDemjanov反応、次に必要に応じて還元、アシル化またはアミノ基の保護基を除去することを特徴とする一般式(1)、及び一般式(2)の化合物の製造法。

【化4】



(2)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、グラム陽性菌、グラム

陰性菌、真菌などに対して抗菌作用を有し、かつプロテインカインースC（以下PKCと記す）を阻害する抗生物質SF2370から誘導される新規化合物及びその製造法に関する。

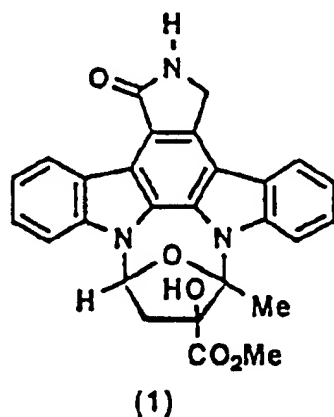
【0002】

【従来の技術】SF2370(1) (M. Sezaki et al., J. Antibiotics, 38, 1437 (1985)) はその抗菌活性に基づき、医薬あるいは農薬として種々の用途に有用な抗生物質（特開昭61-88885号）であり、また細胞増殖や発ガン機構をはじめ生体内の多くの重要な生理反応、各種病態に関わると考えられているPKCを強力に阻害することが知られているK-252aと同一物質である (H. Kase et al., J. Antibiotics, 39, 1059 (1986), H. Kase et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 436 (1987))。一方、スタウロスポリン(2)はSF2370(1)と構造類似の抗生物質で抗菌作用 (S. Omura et al., J. Antibiotics, 30, 275 (1977))、生体防御に重要な役割を果たすマクロファージ賦活物質としての他、現在最強のPKC阻害活性を持つ*

*ことで知られている (T. Tamaoki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 397 (1986))。PKCを特異的阻害剤等で抑制できれば、循環器系の疾病や、アレルギー、炎症、腫瘍、更に老人性疾患等の予防、あるいは治療が可能となり、これまでにない新しいタイプの医薬品になる可能性がある。しかし、化合物(1)、化合物(2)は共に、PKC以外の他のプロテインキナーゼをも阻害する非特異的阻害剤であり、このままでは医療には使用できない。また、この他にスタウロスポリン(2)構造の一部が異なる天然物質が多数知られており、例えば、TAN-1030A(3) (S. Tanida et al., J. Antibiotics, 42, 119 (1989)) や、RK-286C(4) (H. Osada et al., J. Antibiotics, 43, 168 (1990)) がある。このうち化合物(3)はマクロファージ賦活物質として、化合物(4)はPKC阻害活性を持つほか細胞周期に作用する物質として知られている。

【0003】

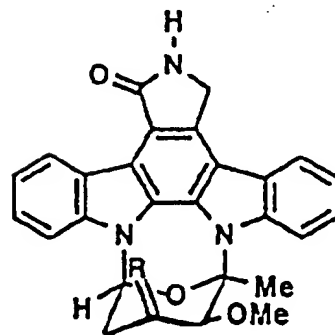
【化5】



【0004】このようにSF2370関連化合物は、その化学構造のごく一部を変化させるだけで更に新しい生理活性を持たせることができる可能性があり、SF2370の構造変換によって、多数の誘導体を合成しその生理活性を検討することは新規医薬品開発の上からも重要である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記のごとく、SF2370(1)及びスタウロスポリン(2)はPKCを阻害するが、より優れたPKC阻害活性をはじめ、有用な生理活性を有する化合物を創製するため、下部構造がス



(2) R = α -H, β -NHMe

(3) R = NOH

(4) R = α -H, β -OH

タウロスポリン(2)のそれと一部異なる一般式(1)のスタウロスポリン型化合物を合成した。この一般式(1)の化合物はスタウロスポリン(2)をはじめ種々のスタウロスポリン型化合物合成の重要な中間体になるものである。

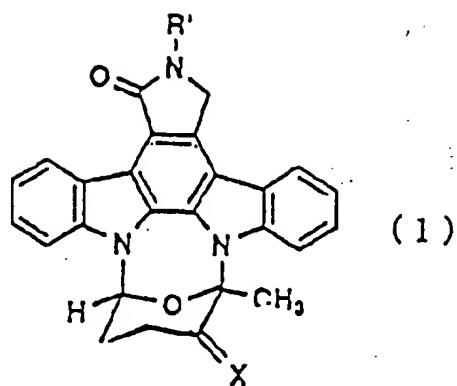
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は新規な一般式

(1)及び一般式(2)

【0007】

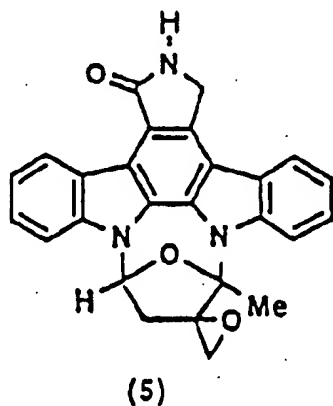
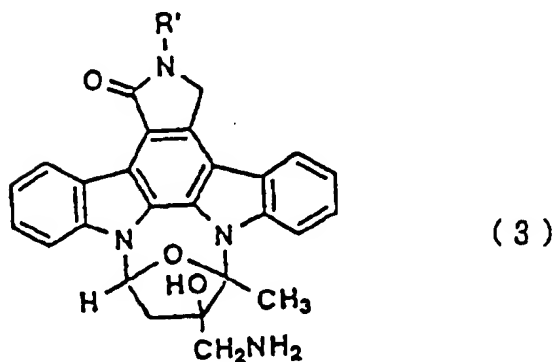
【化6】



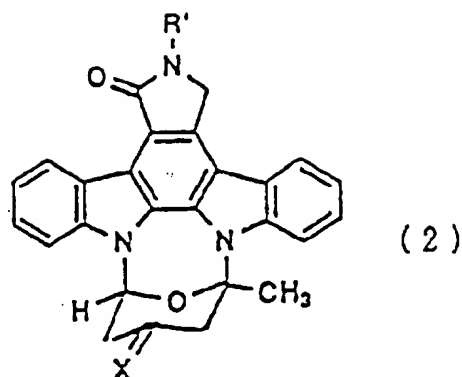
【0008】〔式中、 R^1 は水素原子あるいはホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基より選ばれるアミノ基の保護基を表わし、 $=X$ は $=O$ 、又は H と OR (基中、 R は水素原子又は炭素数1~4の低級アシル基)を表す〕で表される化合物、及び一般式 (3)

【0009】

【化7】



【0013】前記Demjanov転位反応の出発物質として、アミノアルコール誘導体 (6) を用いることができるが、ラクタム窒素を適当な保護基で保護した一般式 (3) で表されるアミノアルコールの方が好都合であ

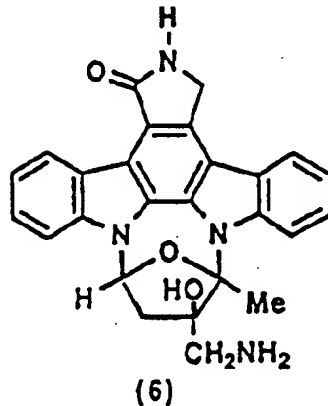


【0010】〔式中、 R^1 は水素原子あるいはホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基より選ばれるアミノ基の保護基を表す〕で表される化合物からDemjanov反応、次に必要に応じて還元、アシル化またはアミノ基の保護基を除去することによる一般式 (1)、及び一般式 (2) の製造法に関するものである。

【0011】出発物質として容易に入手できるSF2370 (1) を用いた。SF2370の下部構造は5員環エーテルであるのに対しスタウロスポリン (2) のそれは6員環エーテルである。合成化学的に5員環化合物から6員環化合物へ環を拡大する方法はいくつかあるが、SF2370 (1) の場合、既にエポキシ誘導体 (5) を経てアミノアルコール誘導体 (6) に変換できる (特開昭62-240689号) ことから、このアミノアルコール部のDemjanov転位環拡大反応を用いることにした。

【0012】

【化8】



る。一般式 (3) のアミノアルコールは、例えば文献 (特開昭62-240689号) に従ってSF2370 (1) から合成できるエポキシ誘導体 (5) のラクタム窒素を適当な保護基で保護した後、この文献 (特開昭6

2-240689号)と同様にアンモニア水またはアンモニア-メタノールと加熱することによって容易に得ることができる。この窒素の保護基として、通常よく使われるホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、*t*-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、メトキシメチル基、メトキシエトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基等を用いることができるが、*t*-ブトキシカルボニル基が好ましい。

【0014】これら一般式(3)のアミノアルコール誘導体に亜硝酸を作用しDemjanov転位を起こさせると環が拡大した一般式(1)で表される6員環ケトン、更に反応条件を変えることによって一般式(2)で表される一般式(1)の異性体を得ることができる。この一般式(1)及び一般式(2)の中の6員環ケトンは具体的には以下に示す方法によって製造される。すなわち、一般式(3)のアミノアルコールを酸の存在下適当な溶媒に懸濁、あるいは溶解させ、これに亜硝酸ナトリウム、あるいは、亜硝酸を作用させることによって製造することができる。溶媒としては、水、酢酸、メタノール、塩化メチレン、クロロホルム、トルエン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等を用いることができ、また、酸としては酢酸、プロピオン酸などの有機酸、硫酸、カンファースルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸等のスルホン酸類のほか、塩酸、硝酸等の無機酸を用いることができる。組合せとしては含水酢酸と亜硝酸ナトリウムを用いるのが好ましい。反応温度、反応時間は溶媒、酸、試薬の組合せによって異なるが、それぞれ、 $-65^{\circ}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、10分～48時間が適当である。含水酢酸中室温、あるいは 50°C では10分～6時間で反応が完結する。この反応では反応温度が $15\sim 50^{\circ}\text{C}$ では目的とする一般式(1)の中の6員環ケトンのほか合成中間体のエポキシ誘導体(5)が副生するが、反応温度を 70°C 以上にすると一般式(1)の中の6員環ケトン、エポキシ誘導体(5)の他に一般式(2)が生成する。これら一般式(1)、一般式(2)の中の6

員環ケトン、及びエポキシ誘導体(5)は常法、すなわち溶媒抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどで単離精製することができる。

【0015】こうして得られた一般式(1)、一般式(2)の中の6員環ケトンはそれぞれ還元、更にはアシル化することによって一般式(1)、一般式(2)の中のアルコール誘導体へと導くことができる。すなわち、一般式(1)、一般式(2)の中のケトンを適当な有機溶媒に溶解させ、還元剤を用いて還元する。有機溶媒としては、水、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、酢酸、塩化メチレン、クロロホルム、トルエン、アセトニトリル、エーテル、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等を用いることができ、また、還元剤としては水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化アルミニウム、水素化アルミニウムリチウムを用いることができ、また接触還元を用いることができる。組合せとしてはメタノール(またはエタノール)中水素化ホウ素ナトリウムを用いるのが好ましい。反応温度、反応時間は、それぞれ、 $-65\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、10分～48時間が適当である。メタノール中室温、あるいは、加熱する条件では30分～20時間で反応は完結する。

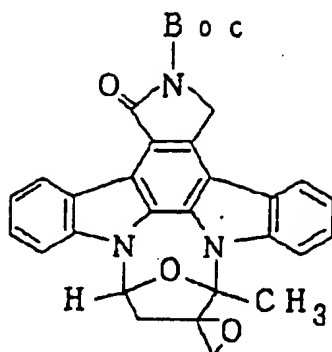
【0016】この還元反応で得られたアルコールは通常の反応条件下でアシル化される。例えば、アルコールのピリジン溶液に無水酢酸と触媒量の4, 4-ジメチルアミノピリジンを加え、室温で2～4時間放置すると相当するアセチル誘導体を好収率で得ることができる。こうして得られた一般式(1)、一般式(2)のこれらのアルコール、及びアセチル体のラクタム窒素の保護基は通常の脱保護の条件でなんら問題なく脱離させることができ、一般式(1)、一般式(2)で表される化合物を容易に得ることができる。

【0017】

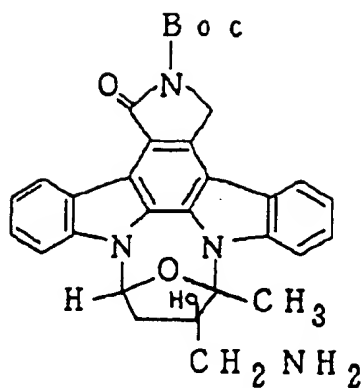
【実施例】以下に本発明の詳細を実施例で説明する。まず本実施例中の化合物の化学構造を記載する。

【0018】

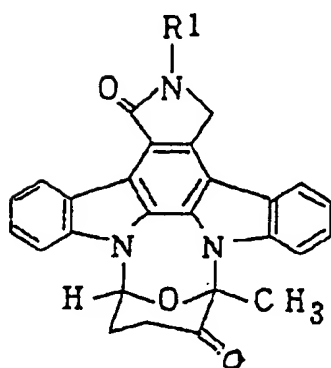
【化9】



化合物 (7)

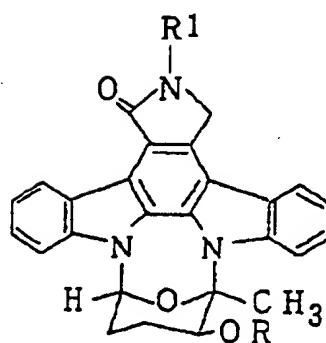


化合物 (8)

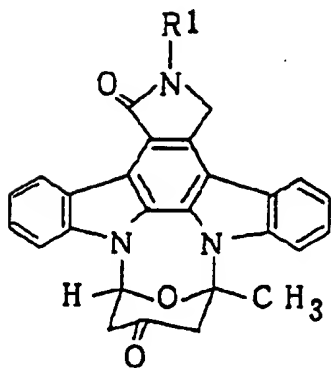


化合物 (9) R1 = Boc

化合物 (10) R1 = H

化合物 (11) R1 = Boc,
R = H

化合物 (12) R1 = R = H

化合物 (13) R1 = Boc,
R = Ac化合物 (14) R1 = H,
R = Ac

化合物 (15) R1 = Boc

【0019】実施例1

化合物 (7) の製造法

化合物 (5) 632mg (1.50mmol) と N, N-ジメチルアミノピリジン 170mg のアセトニトリル (50ml) 溶液に、二炭酸ジ-tert-ブチル 0.52ml (2.3mmol) を滴下し、室温で1時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗った後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/酢酸エチル=4:1) で精製すると、化合物 (7) が淡黄色固形物として703mg (90%) 得られた。

【0020】NMR (CDCl₃) δ: 1.72 (9H, s), 1.91 (1H, d, J=14.5Hz), 2.37 (3H, s), 2.84 (1H, d, J=4.3Hz), 2.96 (1H, d, J=4.3Hz), 3.00 (1H, dd, J=5.6, 14.5Hz), 4.73 (1H, d, J=17.2Hz), 5.06 (1H, d, J=17.2Hz), 6.60 (1H,

d, $J=5.6\text{ Hz}$), 7.15 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$), 7.64 (1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$), 7.79 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$), 9.41 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$)

EIMS m/z : 421 ($M^+ - 100$)

実施例2

化合物(8)の製造法

実施例1のガム状物86.4mg (0.17mmol) のテトラヒドロフラン (1.5ml) 溶液に28%アンモニア水を加え、封管中50℃で1時間加熱撹拌した。反応混合物に酢酸エチルを加え、これを飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=3:1) で分離精製し、淡黄色固形の化合物(8) 66.5mg (74%) を得た。

【0021】NMR (CDCl_3) δ : 1.58 (9H, s), 2.44 (3H, s), 2.81 (1H, d, $J=12.5\text{ Hz}$), 3.00 (1H, s), 3.18 (1H, d, $J=12.5\text{ Hz}$), 4.74 (1H, d, $J=17.0\text{ Hz}$), 4.91 (1H, d, $J=17.0\text{ Hz}$), 6.42 (1H, br), 7.07 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$), 7.22 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$), 7.81 (1H, d, $J=8.3\text{ Hz}$), 7.84 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 8.87 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$)

IR (CHCl_3): 3300, 1755, 1710 cm^{-1}

EIMS m/z : 337 ($M^+ - 101$)

実施例3

化合物(9)の製造法

亜硝酸ナトリウム39mg (0.564mmol) の水溶液を、60℃に加温した化合物(8) 101mg (0.188mmol) の20%酢酸 (10ml) 溶液に一気に加え、30分撹拌後、反応混合物を炭酸水素ナトリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1:1) で分離精製し、まず、化合物(9)を淡黄色固形物として41mg (42%) を、続いて化合物(7)を27mg (28%) を得た。

【0022】化合物(9)

NMR (CDCl_3) δ : 1.72 (9H, s), 2.16 (3H, s), 5.23 (2H, s), 6.67 (1H, br), 7.94 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$), 7.99 (1H, d, $J=8.2\text{ Hz}$), 9.41 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$)

IR (CHCl_3): 1760, 1720 cm^{-1}

SIMS m/z : 521 (M^+)

EIMS m/z : 421 ($M^+ - 100$)

実施例4

化合物(10)の製造法

水冷したケトンの化合物(9) 15.2mgのジクロロメタン (1ml) 溶液にトリフルオロ酢酸0.145mlを加え、10分間撹拌した。反応液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/酢酸エチル=1:1) で精製し、化合物(10)を無色固形物として9.0mg (73%) を得た。

【0023】NMR (CDCl_3) δ : 2.16 (3H, s), 5.02 (1H, d, $J=17\text{ Hz}$), 5.04 (1H, d, $J=17\text{ Hz}$), 6.62 (1H, s), 6.75 (1H, dd, $J=4.0, 5.0\text{ Hz}$), 7.91 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$), 8.00 (1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$), 9.43 (1H, d, $J=8.3\text{ Hz}$)

実施例5

化合物(11)の製造法

化合物(10) 11.5mgのメタノール (0.5ml) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム1mgを加え、0℃で30分間撹拌した。反応液を常法処理し、シリカゲルでクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1:1) を行つて10.6mg (92%) のアルコール体である化合物(11)を淡黄色カラメル状物として得た。

【0024】NMR (CDCl_3) δ : 1.71 (9H, s), 2.38 (3H, s), 4.15 (1H, m), 5.24 (1H, d, $J=15.3\text{ Hz}$), 5.27 (1H, d, $J=15.3\text{ Hz}$), 6.54 (1H, br), 7.94 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 8.07 (1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$), 9.41 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$)

IR (CHCl_3): 3350, 1760, 1710 cm^{-1}

EIMS m/z : 409 ($M^+ - 114$), 366 ($M^+ - 157$)

実施例6

化合物(12)の製造法

化合物(11) 10.8mgを化合物(9)の場合と同様の反応条件で脱保護し、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/酢酸エチル=1:1) を行い、化合物(12)を無色固形物として7.6mg (84%) を得た。

【0025】NMR (CDCl_3) δ : 2.32 (3H, s), 4.13 (1H, m), 4.37 (1H, d, $J=16.8\text{ Hz}$), 4.56 (1H, d, $J=16.8\text{ Hz}$), 5.93 (1H, s), 6.44 (1H, d, $J=3.3\text{ Hz}$), 7.38 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.43 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.66 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$), 8.08 (1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$), 9.13 (1H, d, $J=7.6\text{ Hz}$)

実施例7

化合物(13)の製造法

化合物(11) 10.6mgのピリジン(0.5ml)溶液に無水酢酸0.03ml及び触媒量のN,N-ジメチルアミノピリジンを加え、室温で30分間攪拌した。反応液を常法で処理し、シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=40:1)を行い、10.6mg(92%)の化合物(13)を淡黄色固形物として得た。

【0026】NMR(CDCl₃) δ : 1.72 (9H, s), 1.99 (3H, s), 2.36 (3H, s), 5.34 (2H, s), 5.30~5.40 (1H, m), 6.61 (1H, d, J=3.6 Hz), 7.29 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.67 (1H, d, J=8.3 Hz), 8.01 (1H, d, J=7.3 Hz), 9.47 (1H, d, J=7.9 Hz)

実施例8

化合物(14)の製造法

化合物(13) 10.1mgを化合物(9)の場合と同様の反応条件で脱保護し、シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=1:2)を行い、化合物(14)を無色固形物として7mg(84%)を得た。

【0027】NMR(CDCl₃) δ : 1.96 (3H, s), 2.35 (3H, s), 5.03 (2H, s), 5.33 (1H, dd, J=4.6, 11.6 Hz), 6.57 (1H, d, J=4.0 Hz), 7.15 (1H, s), 7.74 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.92 (1H, d, J=7.6 Hz), 9.47 (1H, d, J=7.9 Hz)

実施例9

化合物(8)から化合物(9)及び化合物(15)の合成

亜硝酸ナトリウム41mg(0.59mmol)を、80℃に加熱したアミノアルコールである化合物(8) 106mg(0.20mmol)の20%酢酸(10ml)溶液に一気に加え、7分攪拌後、反応混合物を炭酸水素ナトリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。実施例3と同様処理し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=1:1)で分離精製し、まず、ケトン体化合物(9)を淡黄色固形物として43mg(42%)、続いてケトン体化合物(15)を淡黄色固形物として13mg(12%)とエポキシ体化合物(7)を32mg(31%)を得た。

【0028】化合物(15)

NMR(CDCl₃) δ : 1.71 (9H, s), 2.28 (3H, s), 2.92 (1H, dd, J=3.6, 15.8 Hz), 3.24 (1H, dd, J=3.6, 7.3 Hz), 3.33 (1H, dd, J=7.3, 15.8 Hz), 3.60 (1H, d, J=15.5 Hz), 5.26 (2H, s), 6.98 (1H, d,

d, J=3.6, 7.3 Hz), 7.29~7.61 (5H, m), 7.72 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.99 (1H, d, J=7.6 Hz), 9.39 (1H, d, J=7.9 Hz)

次にPKCに対する阻害作用の実験方法とそこで得られた活性データについて説明する。

PKCに対する阻害作用

キッカワらの方法(Methods in Enzymology, 99, 288 (1983))に準じてプロテインカイネースC活性を測定した。すなわち、ラットから麻醉下大脳を取り、0.25Mシュウクロース、10mM EGTA、2mM EDTAを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)中でホモジナイズする(全ての操作は4℃で行う)。ホモジネートを105000G、60分間遠心分離して得られた上清をあらかじめ50mM 2-メルカプトエタノール、5mM EGTA、2mM EDTAを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)で平衡化したDE-52カラムに吸着させる。同一の緩衝液で洗浄後、更に50mM 2-メルカプトエタノール、1mM EGTA、1mM EDTAを含む20mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液で再洗浄する。PKCは、再洗浄に使用した緩衝液に溶解したNaCl(0から0.3M)のリニアグラジエントにより溶出し、主ピークを集め酵素液とした。

【0029】PKC活性は、牛胸腺由来のヒストンH1への³²Pの(γ -³²P)ATPからの取り込みを見ることにより測定した。反応系(0.25ml)は5 μ mol Tris-HCl(pH7.5)緩衝液1.25 μ mol酢酸マグネシウム、12.5nmol(γ -³²P)ATP、50 μ gヒストンH1、125nmol塩化カルシウム、200 μ gホスファチジルセリン、4 μ gジオレイン、及び酵素液からなる。ホスファチジルセリンとジオレインはクロロホルム溶液の中で混合し、窒素気流下で溶媒を除いておき、少量の20mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液に懸濁後、超音波処理(0℃、5分)し、ミセルを形成させてから反応系に添加した。バックグラウンド活性は、塩化カルシウム、ホスファチジルセリン、ジオレインの代わりに125nmol EGTAを添加して測定した。

【0030】反応は、30℃、3分間行い、25%トリクロル酢酸3mlを加えて反応を止める。酸沈澱物をニトロセルロース膜で集め、25%トリクロル酢酸3mlで3回洗浄する。ニトロセルロース膜でトラップされた酸沈澱物の放射活性はシンチレーションカウンターにて測定した。PKC阻害作用は溶媒対照群と比較し、%抑制率として表した。供試された化合物の50%PKC阻害濃度[IC₅₀値(μ g/ml)]を表1に示した。

【0031】

表1 プロテインカイネースCに対する阻害活性

サンプル	P K C 阻害率 (% / 40 μ g / ml)	I C ₅₀ 値 (μ g / ml)
SF2370 (K-252a)	96.3	0.21
化合物 (6)	99.3	0.24
化合物 (5)	84.5	0.36
化合物 (10)	100	0.62
化合物 (12)	91.0	0.42
化合物 (14)	94.4	3.0

【0032】

【発明の効果】本発明によって得られる一般式(1)、一般式(2)の化合物の中、ラクタム窒素の保護されていない化合物は強いP K C阻害作用を示し、腫瘍、アレルギー、炎症、痴呆等の医薬品として有用である。ま *

*た、前述のごとく一般式(1)、一般式(2)、及び一般式(3)の化合物はスタウロスポリン(2)及び種々のスタウロスポリン関連化合物合成の重要中間体になると考えられることから、これらの化合物より新たな有用医薬品が合成されると期待できる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 07 D 309:00)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Japanese Kokai Patent Application No. Hei 5[1993]-247054

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Co., Custom Division
P.O. Box 4828, Austin, Texas 78765 USA

Code: PTO 98-2370

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 5[1993]-247054

Technical Disclosure Section

Int. Cl ⁵ .:	C 07 D 498/22 //A 61 K 31/55 (C 07 D 498-22 209:00 273:00 C 07 D 309:00
Sequence Nos. for Office Use:	8415-4C 7252-4C
Application No.:	Hei 4[1992]-45851
Application Date:	March 4, 1992
Publication Date:	September 24, 1993
No. of Claims:	3 (Total of 9 pages)
Examination Request:	Not requested

SF2370 DERIVATIVE AND PRODUCTION METHOD FOR SF2370

[ST-2370 yudotai oyobi sono seizoho]

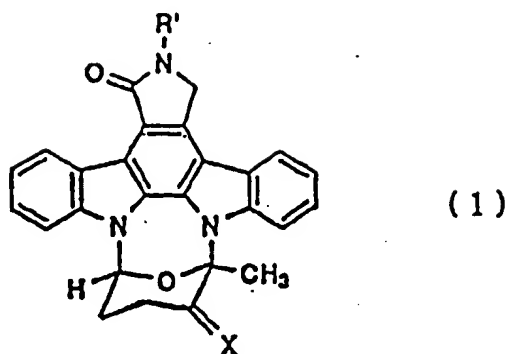
Inventors:	Akio Otsuka, et al.
Applicant:	000006091 Meiji Seika K.K. Chuo-ku, Tokyo

Claims

/2*

1. Compound of Formula (1)

[Structure 1]

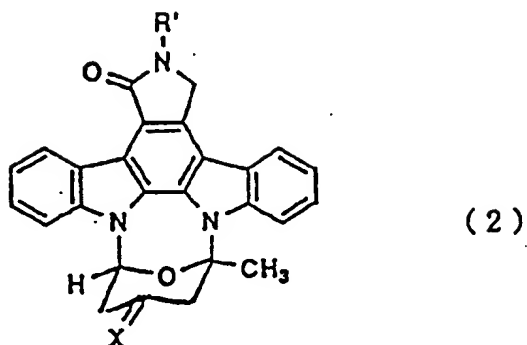


in the formula R^1 represents a protective group for amino groups, chosen from a hydrogen, a formyl group, an acetyl group, a chloroacetyl group, a dichloroacetyl group, a trichloroacetyl group, a trifluoroacetyl group, a t-butoxycarbonyl group, a benzyloxycarbonyl group, a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group, a methoxymethyl group, a methoxyethoxymethyl group, and a benzyloxymethyl group, and $=X$ represents $=O$, or H and OR (in the group R represents hydrogen or a lower acyl group with a carbon number of 1-4)].

* [Numbers in margin indicate pagination in the foreign text.]

2. Compound of Formula (2), i.e.,

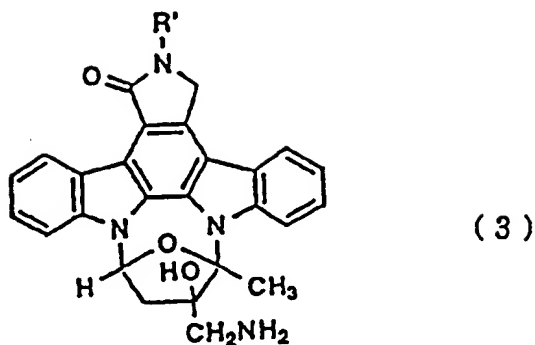
[Structure 2]



in the formula R^1 represents a protective group for amino groups chosen from a hydrogen, a formyl group, an acetyl group, a chloroacetyl group, a dichloroacetyl group, a trichloroacetyl group, a trifluoroacetyl group, a t-butoxycarbonyl group, a benzyloxycarbonyl group, a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group, a methoxymethyl group, a methoxyethoxymethyl group, and a benzyloxymethyl group, and $=X$ represents $=O$, or H and OR (in the group, R represents a hydrogen or a lower acyl group with a carbon number of 1-4)].

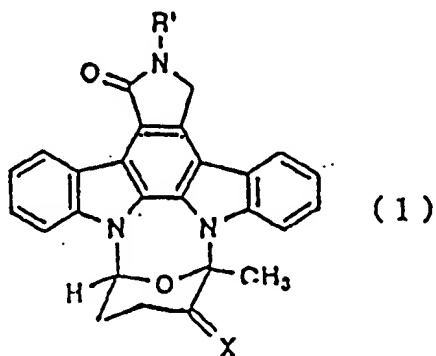
3. A manufacturing method for compounds of Formulas (1) and (2) characterized by carrying out the Demjanov reaction on the compound of Formula (3):

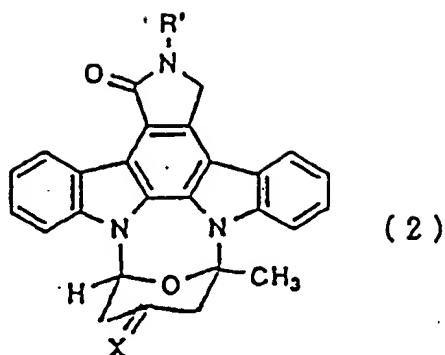
[Structure 3]



in the formula R^1 represents a protective group for amino groups chosen from a hydrogen, a formyl group, an acetyl group, a chloroacetyl group, a dichloroacetyl group, a trichloroacetyl group, a trifluoroacetyl group, a t-butoxycarbonyl group, a benzyloxycarbonyl group, a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group, a methoxymethyl group, a methoxyethoxymethyl group, and a benzyloxymethyl group, and $=X$ represents $=O$, or H and OR (in the group, R represents a hydrogen or a lower acyl group with a carbon number 1-4)], followed by reduction, acylation, or removal of a protective group for the amino groups if necessary:

[Structure 4]





in the formulas R^1 represents H, CHO, CH_3 , or CO, and =X represents =O or H and OR (R represents H or an acyl group with a carbon number of 1-4).

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

The present invention is concerned with a new compounds made using SF2370 as a starting compound for chemical modification having antibacterial effects for Gram positive bacteria, Gram negative-bacteria, or eumycetes, and inhibiting protein Kinase C (PKC).

/3

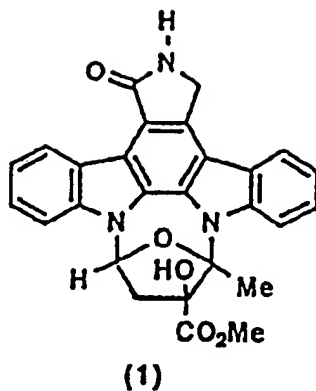
[0002]

Prior art

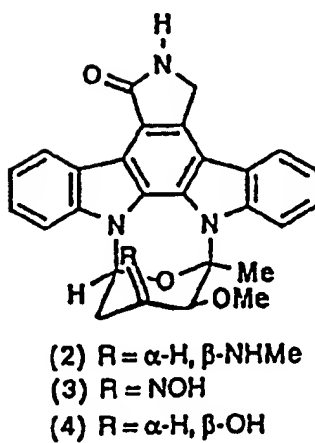
SF2370 (1) M. Sezaki et al., J. Antibiotics 38: 1437 (1985) was an effective antibiotic for various application fields as a drug or an agricultural chemical (Japanese Kokai Patent Application Sho 61[1986]-88885), which was identical to K-252a, known to effectively inhibit PKC, influencing cell growth, the cancer-causing mechanism, the important biological reactions in vivo, or various diseases H.Kase et al., J. Antibiotics 39:1059 (1986), H. Kase et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 142:436 (1987). Staurosporine (2) was known as an antibiotics having a structure similar to SF2370, and activating macrophages which had the antibacterial effect S. Omura et al., J. Antibiotics 30:275 (1977) and which protected in vivo, and having the highest PKC inhibition effect T. Tamaoki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:397 (1986). If PKC was inhibited by a specific inhibitor, it could be used as a new drug to prevent or treat circulatory disorders, allergies, inflammation, ulcers, or geriatric diseases. However, because both compounds (1) and (2) were nonspecific inhibitors inhibiting other types of protein Kinases than PKC, both of them could not be used as drugs by themselves. Many natural compounds having the structure of staurosporine (2), but which were partially different, included the following, i.e., TAN-1030A (3) S. Tanida et al., J. Antibiotics 42:119 (1989); RK-286C (4) H. Osada et al., J. Antibiotics 43:168 (1990). Compound (3) was known as a macrophage activating compound, and compound (4) was known to have the PKC inhibiting activity and influences on the cell cycle.

[0003]

[Structure 5]



Formula (2), (3), (4)



[0004]

The SF2370-related compound could have the new physiological activities when their chemical structures are partially modified. Research on synthesis of many derivatives made by changing the SF2370 structure and its physiological activity is important for new drug development.

[0005]

Problems to be solved by the invention

As mentioned in the previous section, both SF2370 (1) and staurosporine (2) inhibited PKC, but the staurosporine type of compound of Formula (1) having the following structure which was partially different from that of staurosporine (2) was synthesized to obtain a compound having a better PKC inhibition effect and more effective physiological activities than those of staurosporine (2). The compound of Formula (1) could be used as an intermediate for synthesis of the various types of staurosporine compounds.

[0006]

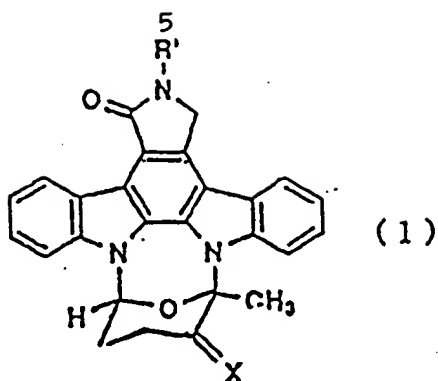
Means to solve the problems

The present invention is concerned with the new compounds of Formulas (1) and (2):

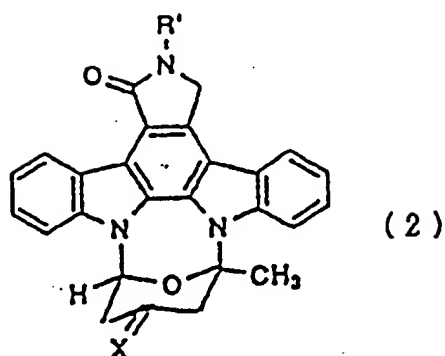
[0007]

[Structure 6]

/4



Formula (2)



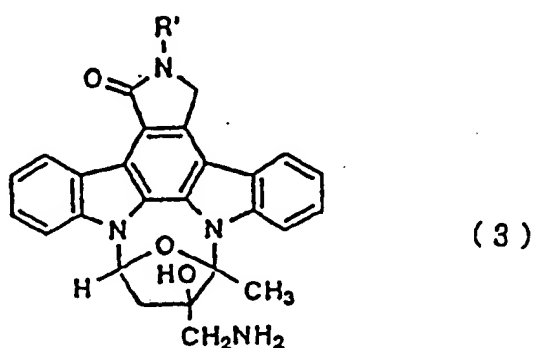
[0008]

In the formula R^1 represents a protective group for amino groups chosen from a hydrogen, a formyl group, an acetyl group, a chloroacetyl group, a dichloroacetyl group, a trichloroacetyl group, a trifluoroacetyl group, a t-butoxycarbonyl group, a benzyloxycarbonyl group, a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group, a

methoxymethyl group, a methoxyethoxymethyl group, and a benzyloxymethyl group, and $=X$ represents $=O$, or H and OR (in the group R represents hydrogen or a lower acyl group with a carbon number of 1-4), and with a method for manufacturing the compounds of formulas (1) and (2) by carrying out the Demjanov reaction on the compound of Formula (3):

[0009]

[Structure 7]



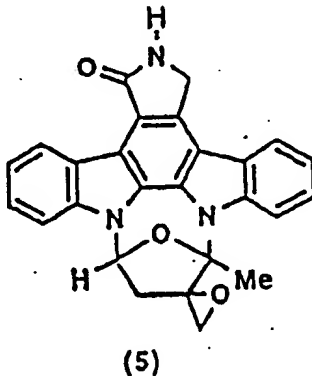
in the formula R^1 represents a protective group for amino groups, chosen from a hydrogen, a formyl group, an acetyl group, a chloroacetyl group, a dichloroacetyl group, a trichloroacetyl group, a trifluoroacetyl group, a t-butoxycarbonyl group, a benzyloxycarbonyl group, a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group, a methoxymethyl group, a methoxyethoxymethyl group, and a benzyloxymethyl group, and $-X$ represents $=O$, or H and OR (in the group R represents hydrogen or a lower acyl group with carbon number 1 to 4)], followed by reduction, acylation, or removal of a protective group for amino groups if necessary.

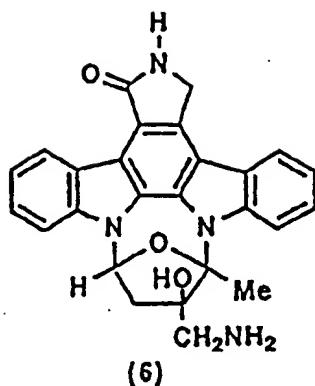
[0011]

SF2370 (1) which could be easily obtained was used as a starting compound. The lower structure of SF2370 is 5-member-ring ether while the lower structure of staurosporine (2) is 6-member-ring ether. There are some synthetic chemistry methods for expansion of a ring from a 5-member ring to a 6-member ring. Since SF2370 (1) can be changed to as amino alcohol derivative (6) by means of epoxy derivative (5) (Japanese Kokai Patent Application Sho No. [1987]62-240689), the Demjanov reaction (transition for ring expansion) was carried out on the amino alcohol.

[0012]

[Structure 8]





[0013]

Amino alcohol derivative (6) can be used as a starting compound for the above-mentioned Demjanov transition. However, the amino alcohol of Formula (3) containing lactam nitrogen protected by a suitable protective group is preferred. The amino alcohol of Formula (3) can be easily made by protecting the lactam nitrogen of epoxy derivative (5) which can be synthesized from SF2370 (1) as described in the reference (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 62[1987]-240689), then heating it with either aqueous ammonia or ammonia-methanol as described in the reference (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 62[1987]-240689). Examples of the protective group for nitrogen include the following, i.e., formyl group; acetyl group; chloroacetyl group; dichloroacetyl group; trichloroacetyl group; trifluoroacetyl group; t-butoxycarbonyl group; benzyloxycarbonyl group; 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl group; methoxymethyl group; methoxyethoxymethyl group; and benzyloxymethyl group. The t-butoxycarbonyl group is especially suitable.

[0014]

The 6-member-ring ketone of Formula (1) with the expanded ring can be made by carrying out the Demjanov transition using an amino alcohol derivative of formula (3) with nitrous acid, and an isomer of Formula (1) represented by formula (2) can be made by carrying out the same Demjanov transition under different conditions. The 6-member-ring ketone contained in both Formulas (1) and (2) can be made in the following process, i.e., either suspending or dissolving the amino alcohol of Formula (3) in a suitable solvent in the presence of acid, followed by adding either sodium nitrite or nitrous acid to it. The following, i.e., water; acetic acid; methanol; methylene chloride; chloroform; toluene; acetonitrile; tetrahydrofuran; ethyl acetate; dimethyl sulfoxide; or dimethyl formamide, can be used as a solvent. An organic acid such as acetic or propionic acid; sulfuric acid, sulfonic acids derived, such as camphorsulfonic acid, or p-toluene sulfonic acid; or inorganic acids such as hydrochloric acid or nitric acid, can be used as the acid. It is suitable to use aqueous acetic acid with sodium nitrite. Both the reaction temperature and time depend on the combination of solvent, acid, and reagent. Reaction temperatures of -65 to 100°C and reaction times of 10 min to 48 h are suitable. The reaction is completed in an aqueous acetic acid at standard temperature or at 50°C for 10 min to 6 h. In the case of carrying out the reaction at 15-50 °C, epoxy derivative (5) (synthetic intermediate) is a by-product in addition to the 6-member-ring ketone contained in Formula (1). In the case of carrying out the reaction at 70°C or higher, Formula (2) is produced in addition to the 6-member-ring ketone in formula (1) and epoxy derivative (5). All of the

6-member-ring ketones contained in Formulas (1) and in (2) and epoxy derivative (5) can be isolated and refined using a conventional method employing solvent extraction followed by silica gel column chromatography.

[0015]

The 6-member-ring ketones contained in Formulas (1) and (2) are separately reduced, then acylated to derive the alcohol derivatives contained in Formulas (1) and (2), respectively. The ketones contained in Formulas (1) and (2) are separately dissolved in a suitable organic solvent then reduced using a reducing agent. Examples of organic solvents include the following, i.e., water; methanol; ethanol; isopropyl alcohol; acetic acid; methylene chloride; chloroform; toluene; acetonitrile; ether; tetrahydrofuran; ethyl acetate; dimethyl sulfoxide; and dimethyl formamide. Examples of reducing agents include the following, i.e., sodium borohydride; lithium borohydride; aluminum hydride; and lithium aluminum hydride. Contact reduction can be carried out. Sodium borohydride is suitably used in methanol (or ethanol). Reaction temperatures of -65 to 50°C, and reaction times of 10 min to 48 h are suitable. The reaction is completed in methanol for 30 min to 20 h at standard temperature or by heating.

[0016]

The alcohols obtained by carrying out the reduction are acylated under conventional reaction conditions. Both acetic acid anhydride and 4,4-dimethylaminopyridine in the amount equivalent

to the catalyst are added to alcohol pyridine solution, followed by allowing it to stand at standard temperature for 2-4 h, to obtain the desired acetyl derivative with a high yield. The alcohols of Formulas (1) and (2), and the protective groups for the lactam nitrogen (acetyl) can be isolated under the conventional conditions for removing protection, and both the compounds of Formulas (1) and (2) can be easily made.

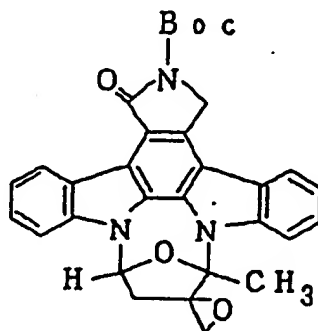
[0017]

Application examples

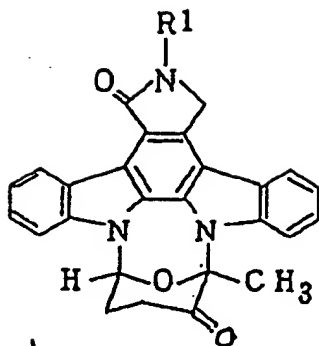
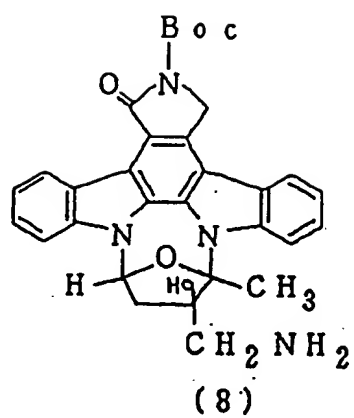
In the following, the details of the present invention are explained with application examples. The chemical structure of each compound used in the application examples is first explained.

[0018]

[Structure 9]



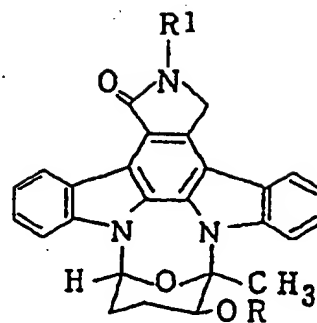
(7)



化合物 (9) R¹ = Boc

化合物 (10) R¹ = H

1



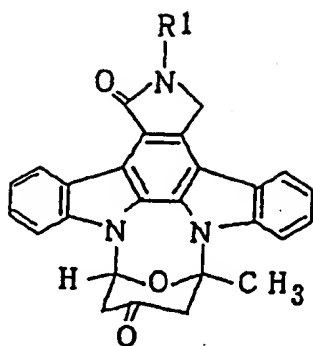
化合物 (11) R¹ = Boc,
R = H

化合物 (12) R¹ = R = H

化合物 (13) R¹ = Boc,
R = Ac

化合物 (14) R¹ = H,
R = Ac

Key: 1 Compound



化合物 (15) R1 = B o c

Key: 1 Compound

[0019]

Application Example 1

Manufacturing method for compound (7)

Di-t-butyl dicarbonate (0.52 mL, 2.3 mmol) was added dropwise to an acetonitrile (50 mL) solution of compound (5) (632 mg) (1.50 mmol) and N,N-dimethylaminopyridine (170 mg), followed by stirring for 1 h at standard temperature. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with both saturated aqueous sodium bicarbonate and sodium chloride, then dried with anhydrous magnesium sulfate. After the solvent was removed, the residues were refined by silica gel column chromatography (chloroform/ethyl acetate = 4:1). A slightly yellow solid compound (703 mg, 90%) was obtained as compound (7).

[0020]

NMR (CDCl₃) δ : 1.72 (9 H, s), 1.91 (1H, d, J=14.5 Hz), 2.37 (3H, s), 2.84 (1H, d, J=4.3 Hz), 2.96 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.00 (1H, dd, J=5.6, 14.5 Hz), 4.73 (1H, d, J=17.2 Hz), 5.06 (1H, d, J=17.2 Hz), 6.60 (1H, d, J=5.6 Hz), 7.15 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.64 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.79 (1H, d, J=7.6 Hz), 9.41 (1H, d, J=7.3 Hz)
EIMS m/z: 421 (M⁺ -100)

/7

Application Example 2

Manufacturing method for compound (8)

28% ammonia water was added to a tetrahydrofuran (1.5 mL) solution of the gummy product (86.4 mg, 0.17 mmol) made in Application Example 1, then heated and stirred at 50°C for 1 h in a sealed pipe. After washing it with saturated sodium chloride, it was dried with anhydrous magnesium sulfate to remove the solvent. The residues were separated and refined by silica gel chromatography (chloroform/methanol = 3:1). A slightly yellow solid (66.5 mg, 74%) was obtained as compound (8).

[0021]

NMR (CDCl₃) δ : 1.58 (9
H, s), 2.44 (3H, s), 2.81 (1H,
d, J=12.5 Hz), 3.00 (1H, s), 3.
18 (1H, d, J=12.5 Hz), 4.74 (1
H, d, J=17.0 Hz), 4.91 (1H, d, J
=17.0 Hz), 6.42 (1H, br), 7.07
(1H, d, J=7.9 Hz), 7.22 (1H, d,
J=7.9 Hz), 7.81 (1H, d, J=8.3 Hz),
7.84 (1H, d, J=7.3 Hz), 8.8
7 (1H, d, J=7.6 Hz)
IR (CHCl₃): 3300, 1755, 1710 cm⁻¹
EIMS m/z: 337 (M⁺ -101)

Application Example 3

Manufacturing method for compound (9)

The entire amount of an aqueous solution of sodium nitrite (39 mg, 0.564 mmol) was added to a 20% acetic acid (10 mL) solution of compound (8) (101 mg, 0.188 mmol) heated to 60°C. After stirring for 30 min, the reaction mixture was neutralized with sodium bicarbonate, followed by extraction using ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated sodium

chloride then dried with anhydrous magnesium sulfate to remove the solvent. The residues were separated and refined by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 1:1). A slightly yellow solid compound (41 mg, 42%) (9), then compound (7) (27 mg, 28%) were made.

[0022]

Compound (9)

NMR (CDCl₃) δ : 1.72 (9H, s), 2.16 (3H, s), 5.23 (2H, s), 6.67 (1H, br), 7.94 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.99 (1H, d, J=8.2 Hz), 9.41 (1H, d, J=7.9 Hz)
IR (CHCl₃): 1760, 1720 cm⁻¹
SIMS m/z: 521 (M⁺)
EIMS m/z: 421 (M⁺ - 100)

Application Example 4

Manufacturing method for compound (10)

Trifluoroacetic acid (0.145 mL) was added to a ice-cold dichloromethane (1 mL) solution of ketone compound (9) (15.2 mg), followed by stirring it for 10 min. Saturated aqueous sodium bicarbonate was added to the reaction solution, then extraction was performed using ethyl acetate, then the organic layer was washed with saturated sodium chloride, then dried with anhydrous magnesium sulfate to remove the solvent. The residues were

refined by silica gel column chromatography (chloroform/ethyl acetate = 1:1). A colorless solid compound (9.0 mg, 73%) was obtained as compound (10).

[0023]

NMR (CDCl₃) δ : 2.16 (3 H, s), 5.02 (1H, d, J=17Hz), 5.04 (1H, d, J=17Hz), 6.62 (1H, s), 6.75 (1H, dd, J=4.0, 5.0 Hz), 7.91 (1H, d, J=7.6 Hz), 8.00 (1H, d, J=8.6 Hz), 9.43 (1H, d, J=8.3 Hz)

Application Example 5

Manufacturing method for compound (11)

Sodium barohydride (1 mg) was added to a methanol (0.5 mL) solution of compound (10) (11.5 mg), then stirred at 0°C for 30 min. The reaction solution was treated by conventional methods, then treated by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 1:1). A slightly yellow caramel-like compound was obtained as compound (11) (alcohol, 10.6 mg, 92%).

[0024]

NMR (CDCl₃) δ : 1.71 (9
H, s), 2.38 (3H, s), 4.15 (1H,
m), 5.24 (1H, d, J=15.3 Hz), 5.
27 (1H, d, J=15.3 Hz), 6.54 (1
H, br), 7.94 (1H, d, J=7.3 Hz),
8.07 (1H, d, J=8.6 Hz), 9.41 (1
H, d, J=7.9 Hz)
IR (CHCl₃) : 3350, 1760, 1710 cm⁻¹
EIMS m/z: 409 (M⁺ -114), 366
(M⁺ -157)

Application Example 6

Manufacturing method for compound (12)

Protection was removed from compound (11) (10.8 mg) under the same reaction conditions used in the case of compound (9), then compound (11) was treated by silica gel chromatography (chloroform/ethyl acetate = 1:1) to obtain a colorless solid compound (7.6 mg, 84%) as compound (12).

[0025]

NMR (CDCl₃) δ : 2.32 (3
H, s), 4.13 (1H, m), 4.37 (1H,
d, J=16.8 Hz), 4.56 (1H, d, J=1
6.8 Hz), 5.93 (1H, s), 6.44 (1
H, d, J=3.3 Hz), 7.38 (1H, d, J=
7.3 Hz), 7.43 (1H, d, J=7.3 H
z), 7.66 (1H, d, J=7.9 Hz), 8.0
8 (1H, d, J=8.6 Hz), 9.13 (1H,
d, J=7.6 Hz)

Application Example 7

Manufacturing method for compound (13)

Both acetic acid anhydride (0.03 mL) and N,N-dimethyl aminopyridine in an amount equivalent to the catalyst were added to a pyridine solution (0.5 mL) of compound (11) (10.6 mg), then stirred at standard temperature for 30 min. The reaction solution was treated by a conventional method, then treated by silica gel chromatography (chloroform/methanol = 40:1). A slightly yellow solid compound was obtained as compound (13) (10.6 mg, 92%).

[0026]

NMR (CDCl₃) δ : 1.72 (9 H, s), 1.99 (3H, s), 2.36 (3H, s), 5.34 (2H, s), 5.30~5.40 (1 H, m), 6.61 (1H, d, J=3.6Hz), 7.29 (1H, d, J=7.9Hz), 7.67 (1 H, d, J=8.3Hz), 8.01 (1H, d, J=7.3Hz), 9.47 (1H, d, J=7.9Hz)

Application Example 8

Manufacturing method for compound (14)

Protection was removed from compound (13) (10.1 mg) under the same reaction conditions used in the case of compound (9), then compound (13) was treated by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 1:2) to obtain a colorless solid compound (7 mg, 84%) as compound (14).

[0027]

NMR (CDCl₃) δ : 1.96 (3 H, s), 2.35 (3H, s), 5.03 (2H, s), 5.33 (1H, dd, J=4.6, 11.6Hz), 6.57 (1H, d, J=4.0Hz), 7.15 (1H, s), 7.74 (1H, d, J=8.6Hz), 7.92 (1H, d, J=7.6Hz), 9.47 (1H, d, J=7.9Hz)

Application Example 9

Synthesis of both compounds (9) and (15) from compound (8)

The entire amount of sodium nitrite (41 mg, 0.59 mmol) was added to a 20% acetic acid (10 mL) solution of compound (8) (106 mg, 0.20 mmol) (amino alcohol heated to 80°C), then stirred for 7 min. Then, the reaction mixture was neutralized with sodium bicarbonate then extracted with ethyl acetate. The same treatment used in Application Example 3 was used, then it was separated and refined by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1:1) to obtain a slightly yellow solid compound (43 mg, 42%) as ketone compound (9), then both a slightly yellow solid compound (13 mg, 12%) as ketone compound (15) and epoxy compound (7) (32 mg, 31%).

[0028]

Compound (15)

NMR (CDCl₃) δ : 1.71 (9H, s), 2.28 (3H, s), 2.92 (1H, dd, J=3.6, 15.8 Hz), 3.24 (1H, dd, J=3.6, 7.3 Hz), 3.33 (1H, dd, J=7.3, 15.8 Hz), 3.60 (1H, d, J=15.5 Hz), 5.26 (2H, s), 6.98 (1H, d, J=3.6, 7.3 Hz), 7.29~7.61 (5H, m), 7.72 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.99 (1H, d, J=7.6 Hz), 9.39 (1H, d, J=7.9 Hz)

In the following, an experimental method for inhibition of PKC and experimentally obtained data for activation are explained.

Inhibition of PKC

The method introduced by Kikkawa, et al. Methods in Enzymology, 99, 288 (1983), the protein Kinase C activity was measured. The cerebrum was obtained from an anesthetized rat, then homogenized in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.25 M sucrose, 10 mM EGTA, and 2 mM EDTA (all of the operation were performed at 4°C). The supernatant was obtained by centrifugal separation of the homogenate at 105,000 G for 60 min, then adsorbed on a DE-52 column equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM EGTA, and 2 mM EDTA. After washing it with the same buffer, it was rewashed with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA, and 1 mM EDTA. PKC was eluted with a NaCl gradient (0-0.3 M) dissolved in the same buffer used for rewashing, then the main peaks were collected to obtain the enzyme solution.

[0029]

The PKC activity was measured by observing ^{32}P introduced from (γ - ^{32}P) ATP into histone H1. The reaction system (0.25 mL) consists of 5 μmol Tris-HCl (pH 7.5) buffer, 1.25 μmol magnesium acetate, 12.5 nmol (γ - ^{32}P)-ATP, 50 μg histone H1, 125 nmol calcium chloride, 200 μg phosphatidylserine, 4 μg diolein, and enzyme solution. Phosphatidylserine was mixed with diolein in the

chloroform solution, then the solvent was removed by a nitrogen flow, then the mixture was suspended in a small amount of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, followed by ultrasonic treatment (0°C, 5 min) to form micelles then added to the reaction system. The background activity was measured by adding 125 nmol EGTA instead of calcium chloride, phosphatidyl serine, or diolein.

[0030]

The reaction was carried out at 30°C for 3 min, then stopped by adding 3 mL 25% trichloroacetic acid. The acid precipitate was collected on a nitrocellulose membrane, then washed with 25% trichloroacetic acid (3 mL) 3 times. The radioactivity was measured by a scintillation counter. The PKC inhibition effect was compared with a solvent control, and indicated as a% inhibition ratio. Table I shows the 50% PKC inhibition concentration IC₅₀ value (μg/mL) of each compound used as a sample.

[0031]

Table I. Inhibition activity for protein Kinase C

/9

1 サンプル	PKC阻害率 3 (%/40 μg/ml)	IC ₅₀ 値 4 (μg/ml)
SF2370 (K-252a)	96.3	0.21
化合物 (6)	99.3	0.24
化合物 (5)	84.5	0.36
2 化合物 (10)	100	0.62
化合物 (12)	91.0	0.42
化合物 (14)	94.4	3.0

Key: 1 sample
 2 compound
 3 PKC inhibition ratio
 4 IC50 value

[0032]

Effect of the invention

Either compound of Formula (1) or (2) with lactam nitrogen, obtained by the present invention exhibited a good PKC inhibition effect, and is suitable as a drug for ulcers, allergies, inflammation, or dementia [sic]. Because it is assumed that the compound of Formula (1), (2), or (3), becomes an important intermediate for synthesis of staurosporine (2) or the various staurosporine-related compounds, synthesis of a new drug from the compounds is expected.